

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.014

· 基础研究 ·

多肽 A28 增强顺铂对结肠癌细胞株 HCT-116 的杀伤作用

张 军¹, 谭诗云^{1△}, 陈建华^{2△}, 张 剑², 陈彩虹²(1. 武汉大学人民医院 消化内科, 湖北 武汉 430060; 2. 武汉凯泰新生物技术有限公司, 湖北 武汉 430074)

[摘要] 目的: 探讨计算机辅助药物设计合成研发的特异性多肽 A28 增强顺铂对结肠癌细胞的杀伤效应。方法: 以结肠癌细胞 HCT-116 和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为实验对象, 设定 A28 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 顺铂的浓度为 10、30 及 90 $\mu\text{mol/L}$ 。MTT 法检测 A28 联合顺铂对 HCT-116 细胞和 HUVEC 细胞生长的影响, 流式细胞术检测 A28 联合顺铂对 HCT-116 细胞凋亡的影响。结果: 顺铂浓度依赖性地抑制 HCT-116 细胞的增殖, A28 显著增强顺铂对 HCT-116 细胞增殖的抑制及致凋亡作用。A28 联合 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂对 HCT-116 细胞增殖的抑制率为(43.3 \pm 0.03)%, 显著高于单用顺铂组的(15.6 \pm 0.10)%($P < 0.01$); 进一步提高联合用药的顺铂浓度(30、90 $\mu\text{mol/L}$)时, 对 HCT-116 细胞增殖抑制率与 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂时没有显著差别($P > 0.05$)。A28 联合 1.1、3.3、10、30 或 90 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂时, HCT-116 细胞的凋亡率[(6.0 \pm 0.07)%、(14.5 \pm 0.03)%、(34.7 \pm 0.07)%、(37.3 \pm 0.08)%、(40.6 \pm 0.02)%]高于单用顺铂组[(5.1 \pm 0.06)%、(8.3 \pm 0.02)%、(14.6 \pm 0.08)%、(19.8 \pm 0.07)%、(32.6 \pm 0.02)%]($P < 0.01$)。10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂联合 20 $\mu\text{mol/L}$ A28 可以有效杀伤 HCT-116 细胞, 且对 HUVEC 的毒性作用较小。结论: 多肽 A28 可提高顺铂对结肠癌细胞株 HCT-116 的杀伤效果, 减轻对正常 HUVEC 的毒性作用。

[关键词] 结肠癌; 顺铂; 多肽; 计算机辅助药物设计

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0318-04

Polypeptide A28 enhances cytotoxic effect of cisplatin on colon cancer cell line HCT-116

ZHANG Jun¹, TAN Shi-yun^{1△}, CHEN Jian-hua^{2△}, ZHANG Jian², CHEN Cai-hong²(1. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China; 2. Wuhan KatyGen Pharmaceuticals, Inc. Wuhan 430074, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of polypeptide A28, which was designed by computer aided drug designing system, on the cytotoxic effect of cisplatin against colon cancer cells. **Methods:** Colon cancer cell line HCT-116 and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used in the present study. The concentration of polypeptide A28 was 20 $\mu\text{mol/L}$ and those of cisplatin were 10, 30 and 90 $\mu\text{mol/L}$. The effects of polypeptide A28 combined with cisplatin on the growth of HCT-116 and HUVEC cells were measured by MTT; their effects on the apoptosis of HCT-116 cells were examined by flow cytometry. **Results:** Cisplatin dose-dependently inhibited proliferation of HCT-116 cells; A28 further enhanced the inhibitory effect of cisplatin on HCT-116 cells and increased apoptosis induction effect of cisplatin on HCT-116 cells, with the growth inhibition rate of the combination group being (43.3 \pm 0.03)%, which was significantly higher than that of the cisplatin single group (15.6 \pm 0.10)%($P < 0.01$). In combination group, when cisplatin concentrations (30, 90 $\mu\text{mol/L}$) were increased, the inhibitory effects on HCT-116 cells were not increased compared with the 10 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin combination group ($P > 0.05$). A28 combined with cisplatin (1.1, 3.3, 10, 30, or 90 $\mu\text{mol/L}$) induced apoptosis of more HCT-116 cells than cisplatin single group did ($P < 0.01$). Cisplatin at 10 $\mu\text{mol/L}$ combined with A28 at 20 $\mu\text{mol/L}$ effectively killed HCT-116 cells, whereas with less toxic effect on HUVEC cells. **Conclusion:** Polypeptide A28 can enhance the cytotoxic effect of cisplatin on colon cancer cell line HCT-116 and decrease its lethal effect on HUVEC.

[作者简介] 张军(1981-)男, 山东省青岛市人, 硕士生, 主要从事消化道肿瘤治疗方面的研究。E-mail: zhangjun0532027@126.com

[通信作者] 谭诗云(TAN Shi-yun, corresponding author), E-mail: tanshiyun@medmail.com.cn; 陈建华(CHEN Jian-hua, corresponding author), E-mail: chenjianhua@katygenpharma.com。[△]为共同通信作者

[**Key words**] colon cancer; cisplatin; polypeptide; computer aided drug design

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 318-321]

结肠癌是临床上常见的恶性肿瘤,在世界范围内其发病率高居第 3 位,病死率高居前列^[1]。肿瘤治疗的方法虽不断发展与更新,但是结肠癌的治疗方法亟待进一步完善^[2]。铂类制剂中的顺铂(cisplatin, DDP)对结肠癌有明显的治疗效果,但因其毒性作用较大使其应用受到了一定的限制^[3,4]。本课题前期通过计算机辅助药物设计合成的抗肿瘤凋亡多肽 A28 有增加顺铂类化疗药物抗肿瘤敏感性的特性^[5]。研究^[6-7]表明,A28 多肽包含一特殊 N2 结构域(SH2SH3SH2 结构域),该结构域能增加宫颈癌 HeLa 细胞对顺铂的敏感性。本实验以结肠癌细胞 HCT-116 和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为研究对象,初步探讨特异性多肽 A28 对顺铂抗结肠癌细胞的增强效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料

结肠癌 HCT-116 细胞株购自中国科学院上海细胞库,属低分化腺癌细胞系。人脐静脉内皮细胞株 HUVEC 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 Blender 公司。特异性多肽 A28 购自武汉凯泰新生物技术有限公司,顺铂购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养和实验分组

HCT-116 细胞、HUVEC 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中孵育。实验时取对数生长期细胞。通过先期实验^[5]发现,A28 对 HeLa 细胞的 IC₅₀ 为 20 μmol/L。本实验中 A28 与顺铂联合应用时选择作用浓度为 20 μmol/L。

实验分 3 组:顺铂(I 组)、顺铂 + A28(II 组)及 HUVEC 对照组,I 组与 II 组顺铂均设定同样的终浓度梯度(1.1、3.3、10、30 及 90 μmol/L),对照组加入 10 μmol/L 顺铂 + 20 μmol/L A28、20 μmol/L A28 + 90 μmol/L 顺铂和 90 μmol/L 顺铂。

1.3 MTT 法检测药物对细胞生长的抑制率

收集对数生长期 HCT-116 细胞和 HUVEC 细胞,以 2×10^4 个/ml 的密度接种细胞于 96 孔培养板,每孔加入 200 μl。孵育 24 h 后,铺有 HCT-116 细胞加入预设浓度顺铂或顺铂 + A28 共同孵育,铺有 HUVEC 细胞加入预设浓度顺铂 + A28 或顺铂共

同孵育,每个浓度设 3 个复孔,同时设立不加药物的空白对照。继续培养 24 h,弃孔内液体,每孔加入 200 μl MTT(质量浓度为 0.5 mg/ml),培养 4 h,弃孔内液体,加入 200 μl DMSO。振荡 10 min 后酶标仪测光密度(D_{570}),按公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%) = (对照组 D_{570} - 实验组 D_{570}) / 对照组 D_{570} × 100%。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

取对数生长期的 HCT-116 细胞,以 1×10^6 /ml 的密度接种于 6 孔培养板,孵育 24 h,弃培养液,加入预设浓度的顺铂和顺铂 + A28 共同孵育 24 h,收集各组培养悬浮细胞和用胰酶消化的细胞,1 500 × g 离心 10 min,弃上清。预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,并将细胞重悬于 195 μl 的结合缓冲液中,加入 5 μl Annexin V-FITC,室温、避光反应 10 min,加入 5 μl PI 混匀,室温、避光反应 5 min。筛网过滤后,上机检测细胞凋亡率。

1.5 统计学处理

所有结果数值均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 软件进行统计分析,多个样本之间的比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A28 促进顺铂对 HCT-116 细胞增殖的抑制

实验结果显示,联合用药组对 HCT-116 细胞增殖的抑制率随着顺铂浓度的增加而增加,浓度 1.1、3.3、10、30 及 90 μmol/L 时其抑制率为(8.8 ± 0.04)%、(15.7 ± 0.06)%、(43.3 ± 0.03)%、(46.4 ± 0.04)% 及(47.6 ± 0.02)% ,其抑制率高于单用顺铂组的抑制率[(5.8 ± 0.08)%、(10.9 ± 0.08)%、(15.6 ± 0.10)%、(24.4 ± 0.06)% 及(36.0 ± 0.01)%]。值得注意的是联合用药组中 A28 浓度 20 μmol/L 与顺铂浓度为 10、30 及 90 μmol/L 联合应用时,其对 HCT-116 细胞增殖的抑制已进入平台状态。

2.2 A28 促进顺铂对 HCT-116 细胞的致凋亡作用

实验结果(图 1,表 1)显示,联合用药组当顺铂浓度为 3.3、10、30 及 90 μmol/L 时的凋亡率高于单用顺铂组($P < 0.01$)。联合用药组中顺铂浓度为 10、30 及 90 μmol/L 的 3 亚组对 HCT-116 细胞的凋亡率间差异无统计学意义($P > 0.05$,见表 1)。

2.3 A28 和顺铂单用或联用对 HUVEC 细胞的毒性作用

实验结果显示,顺铂 10 μmol/L + 20 μmol/L A28、顺铂 90 μmol/L + 20 μmol/L A28、顺铂 90 μmol/L 对人正常 HUVEC 细胞增殖的抑制率分别为 (8.7 ± 0.02)%、(47.2 ± 0.05)%、(35.2 ± 0.07)%。对照 A28 联合顺铂对 HCT-116 结肠癌细

胞的作用效果,10 μmol/L 顺铂 + 20 μmol/L A28 时 HCT-116 的抑制率已高达 (43.3 ± 0.03)% , 而该剂量对正常HUVEC的毒性抑制却很低;如将顺铂浓度增加到 90 μmol/L 时,对肿瘤细胞的抑制还在同一水平[抑制率为(47.6 ± 0.02)%],但对正常 HUVEC 的毒性却大大增加。

表 1 不同浓度顺铂和 A28 联合作用对 HCT-116 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Effects of different concentrations of cisplatin combined with polypeptide A28 on apoptosis of HCT-116 cells($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Cisplatin concentration ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	1.1	3.3	10	30	90
Cisplatin	5.1 ± 0.06	8.7 ± 0.02	14.6 ± 0.08	19.8 ± 0.07	32.6 ± 0.02
Cisplatin + A28(20 μmol/L)	6.0 ± 0.07	14.5 ± 0.03*	34.7 ± 0.07**	37.3 ± 0.08**	40.6 ± 0.02**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs cisplatin

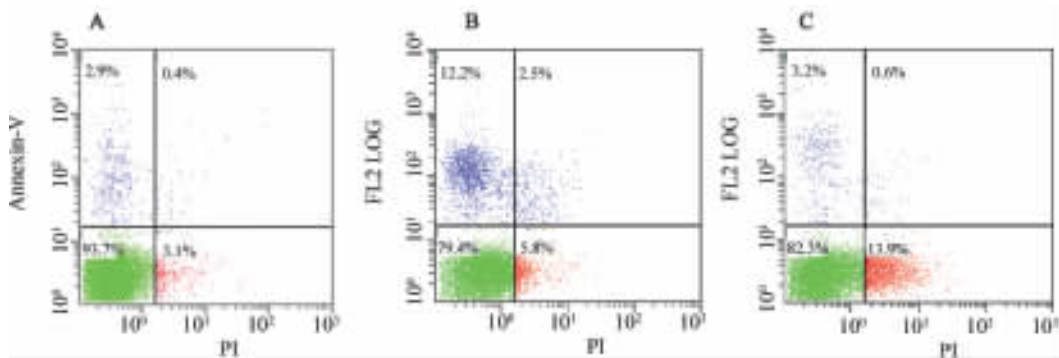


图 1 A28 联合顺铂诱导 HCT-116 细胞凋亡

Fig.1 Cisplatin combined with polypeptide A28 induced apoptosis of HCT-116 cells

A: Ctrl; B: 3.3 μmol/L DDP; C: 3.3 μmol/L DDP + 20 μmol/L A28

3 讨论

顺铂是一类通过与 DNA 链形成链内与链间的交叉结合,从而干扰 DNA 的合成,导致细胞周期阻滞并诱导肿瘤细胞发生凋亡,以达到杀伤肿瘤细胞的作用^[8]。尽管顺铂治疗肿瘤效果显著,但因其有严重的毒性作用,如剧烈的恶心、呕吐、骨髓抑制、肾脏损伤和神经毒性等^[9-11],从而限制了其临床广泛应用。如何增强抗癌药物对肿瘤组织的特异性而减少其毒性作用是近年来研究热点。

计算机辅助药物设计(computer aided drug design, CADD)是近年兴起的研发新药的一种崭新技术^[12]。此技术是基于蛋白质相互作用可快速便捷地寻找抗癌药物^[13]。特异性抗癌多肽 A28 正是采用此项技术,经过蛋白质同源模建、蛋白质对接、

分子动力学模拟、结合自由能预测、能量分子模拟、结合合成等步骤^[5]合成的多肽。并证实 A28 能增加宫颈癌 HeLa 细胞对顺铂的敏感性^[6-7]。

本实验中,单用顺铂 1.1、3.3、10 μmol/L 时,对 HCT-116 细胞的抑制率仅为 (5.8 ± 0.08)%、(10.9 ± 0.08)%、(15.6 ± 0.10)% ,HCT-116 细胞凋亡率仅为 (5.1 ± 0.06)%、(8.7 ± 0.02)%、(14.6 ± 0.08)% ;当顺铂增加为 90 μmol/L 时,对肿瘤细胞抑制率增至 (36.0 ± 0.01)% ,HCT-116 细胞凋亡率增至 (32.6 ± 0.02)%。显而易见,高浓度顺铂抗肿瘤作用显著优于低浓度顺铂,但是不良反应明显加重。联合用药后,联合用药组对肿瘤细胞 HCT-116 增殖的抑制率及 HCT-116 细胞凋亡率明显优于单用顺铂各组,提示 A28 可以明显增加顺铂的敏感性。Michod 等^[6]发现 RasGAP 的一个特殊的

N2 结构域(即 SH2SH3SH2 结构域)能增加肿瘤细胞对顺铂类化疗药物敏感性。Michod 等^[14]还发现 N2 结构域是一段包含 10 个氨基酸的序列,该序列通过融合一种具有细胞膜穿透能力的多肽 TAT^[15],在此基础上合成的一种具有增敏作用且易穿透细胞膜的多肽-TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆,该多肽显著增强肿瘤细胞对基因毒类化疗药物的敏感性。

本研究中使用的 A28 包含了该结构域的一段氨基酸序列,N2 结构域中的 SH3 结构域可以与 G3BP(GAP SH3-binding protein)发生特异性的结合,从而调控细胞的生长进程。Guitard 等^[16]发现 G3BP 在某些肿瘤细胞如结肠腺癌、乳腺癌、头颈部肿瘤中会过度表达,特异性抗肿瘤多肽 A28 具有针对肿瘤细胞特有的靶向能力。通过其作用 G3BP 靶点诱导肿瘤细胞凋亡,从而与顺铂发生协同作用和增敏作用。目前特异性多肽 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆能够增加肿瘤细胞对基因毒类化疗药物的敏感性的具体分子机制仍在进一步研究中,Michod 等^[17]发现特异性多肽 TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆增敏作用的发挥需要 P53 来协助完成,P53 通过 DNA 依赖蛋白激酶来磷酸化 NH2 端以保持其对 DNA 损伤的敏感性^[18]。

本实验还发现,当顺铂仅为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,联合用药组抑制率和凋亡率急剧上升,达到了(43.3 \pm 0.03)%和(34.7 \pm 0.07)%。当继续增加顺铂浓度至 30、90 $\mu\text{mol/L}$,其对肿瘤细胞的抑制进入平台期,但其毒性作用却大幅增加。浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 + 20 $\mu\text{mol/L}$ A28 对正常 HUVEC 细胞增殖的抑制率为(8.7 \pm 0.02)% ,远低于顺铂 90 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ A28 + 90 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂对 HUVEC 细胞增殖的抑制率[(35.2 \pm 0.07)% 和(47.2 \pm 0.05)%] ($P < 0.01$)。由此可见联合用药时,顺铂浓度达到一定量后其抗肿瘤作用进入平台状态,此时若盲目增加顺铂剂量其抗肿瘤作用增加并不明显,但其毒性作用却大幅增加。本实验提示,A28 可能是一种较理想的铂类化疗药物的增敏剂,10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂与 20 $\mu\text{mol/L}$ A28 合用,可以达到最大杀伤肿瘤细胞效果,但毒性作用较小。综上所述,A28 多肽类药物具有潜在的临床应用价值。

[参 考 文 献]

[1] Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KJ, Nikiforova MN, et al. The role of K-Ras mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer [J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(10): 1600-1606.
[2] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient

mice [J]. Nature, 2007, 445 (7123): 106-110.

- [3] Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 42 (3): 317-325.
[4] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(4): 307-320.
[5] 陈建华,黄毅,熊骏宇,陈彩虹. 治疗或预防癌症的多肽或衍生产物及其应用: 中国, 200810197085.1 [P]. 2008-10-19.
[6] Michod D, Yang JY, Chen J, Bonny C, Widmann C. A RasGAP-derived cell permeable peptide potently enhances genotoxin-induced cytotoxicity in tumor cells [J]. Oncogene, 2004, 23 (55): 8971-8978.
[7] Michod D, Widmann C. DNA-damage sensitizers: Potential new therapeutical tools to improve chemotherapy [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2007, 63(2): 160-171.
[8] Shahzad MM, Lopez-Berestein G, Sood AK. Novel strategies for reversing platinum resistance [J]. Drug Resistance Updates, 2009, 12(6): 148-152.
[9] Schiff D, Wen PY, van den Bent MJ. Neurological adverse effects caused by cytotoxic and targeted therapies [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(10): 596-603.
[10] Kaushal GP, Kaushal V, Herzog C, Yang C. Autophagy delays apoptosis in renal tubular epithelial cells in cisplatin cytotoxicity [J]. Autophagy, 2008, 4(5): 710-712.
[11] Lee S, Kim W, Moon SO, Sung MJ, Kim DH, Kang KP, et al. Rosiglitazone ameliorates cisplatin-induced renal injury in mice [J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(8): 2096-2105.
[12] Song CM, Lim SJ, Tong JC. Recent advances in computer-aided drug design [J]. Brief Bioinform, 2009, 10(5): 579-591.
[13] Kapetanovic IM. Computer-aided drug discovery and development (CADD): Insilico-chemico-biological approach [J]. Chem Biol Interact, 2008, 171(2): 165-176.
[14] Michod D, Annibaldi A, Schaefer S, Dapples C, Rochat B, Widmann C. Effect of RasGAP N2 fragment-derived peptide on tumor growth in mice [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(11): 828-832.
[15] Cardozo AK, Buchillier V, Mathieu M, Chen J, Ortis F, Ladrière L, et al. Cell-permeable peptides induce dose-and length-dependent cytotoxic effects [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1768(9): 2222-2234.
[16] Guitard E, Parker F, Millon R, Abecassis J, Tocqué B. G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry [J]. Cancer Lett, 2001, 165(2): 213-221.
[17] Michod D, Widmann C. TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ require P53 and PUMA to sensitize tumor cells to genotoxins [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(5): 497-507.
[18] Cordenonsi M, Montagner M, Adorno M, Zacchigna L, Martello G, Mamidi A, et al. Integration of TGF- β and Ras/MAPK signaling through P53 phosphorylation [J]. Science, 2007, 315 (5813): 840-843.

[收稿日期] 2010 - 02 - 14

[修回日期] 2010 - 04 - 17

[本文编辑] 韩 丹